

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ÁCIDO GÁLICO Y DE LA CATEQUINA
SOBRE *Helicobacter pylori* Y *Escherichia coli***

ROBERTO OCTAVIO DÍAZ GÓMEZ

Santiago, Chile
2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ÁCIDO GÁLICO Y DE LA CATEQUINA
SOBRE *Helicobacter pylori* Y *Escherichia coli***

**ANTIBACTERIAL EFFECT OF THE GALLIC ACID AND OF THE CATECHIN
AGAINST *Helicobacter pylori* AND *Escherichia coli***

ROBERTO OCTAVIO DÍAZ GÓMEZ

Santiago, Chile
2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

EFEECTO ANTIBACTERIANO DEL ÁCIDO GÁLICO Y DE LA CATEQUINA
SOBRE *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*

Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo
Mención Enología

ROBERTO OCTAVIO DÍAZ GÓMEZ

	Calificaciones
Profesores Guías	
Sr. Elías Obreque S. Ing. Agrónomo, Dr.	6,8
Sr. Héctor Toledo A. Químico Farmacéutico, Dr.	7,0
Profesores Evaluadores	
Sr. Remigio López S. Químico Farmacéutico, Bioquímico, Dr.	6,8
Sr. Alfredo Olivares E. Ing. Agrónomo, MSc.	5,5

Santiago, Chile
2012

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios por darme la fortaleza para realizar con éxito este arduo trabajo.

A mis dos profesores guías, Héctor Toledo y Elías Obreque.

A mis padres, Pedro y Margarita por apoyarme durante estos 7 años de estudio.

A mis 3 hermanos: Pedro, Vero y Claudio.

A mis grandes amigos: Sofi, Abi y Ricardo.

A mis compañeros de laboratorio: Óscar, Aníbal, Manuel y Nico.

INDICE

RESUMEN.....	1
PALABRAS CLAVES.....	1
ABSTRACT.....	2
KEY WORDS.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
LUGAR DE ESTUDIO.....	6
MATERIALES.....	6
Materiales y reactivos.....	6
Equipamiento.....	6
Cepas Bacterianas.....	6
Medios de cultivo.....	7
MÉTODOS.....	7
Diseño de experimentos.....	7
Procedimientos.....	7
Variables a medir.....	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ÁCIDO GÁLICO.....	13
Ensayo de la actividad antibacteriana sobre <i>H. pylori</i> y <i>E. coli</i>	13
Determinación del halo de inhibición en el crecimiento bacteriano.....	15
Cinética de la inhibición del crecimiento bacteriano.....	16
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA CATEQUINA.....	18
Ensayo de la actividad antibacteriana sobre <i>H. pylori</i> y <i>E. coli</i>	18
Determinación del halo de inhibición de crecimiento.....	20
Cinética de la inhibición del crecimiento bacteriano.....	22
ESTUDIO DE LA ACCIÓN SINÉRGICA DE ÁCIDO GÁLICO Y CATEQUINA.....	23
Efecto antibacteriano de la catequina en presencia de ácido gálico.....	23
Efecto antibacteriano del ácido gálico en presencia de catequina.....	26
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

Los polifenoles son compuestos generados a partir del metabolismo secundario de las plantas que presentan entre otras, actividad antibacteriana. Entre los polifenoles se encuentra el ácido gálico (no flavonoide) y la catequina (flavonoide). *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa, de forma bacilar espiralada, microaerofílica, flagelada, neutrófila, que habita en la capa mucosa que recubre el epitelio del estómago humano. Se estima que el 50% de la población mundial está infectada con la bacteria, alcanzando un 73% de prevalencia en la población en Chile. Ésta está relacionada con enfermedades como gastritis, úlceras y es un factor de alto riesgo para adquirir cáncer gástrico. Las terapias de erradicación de *H. pylori* consisten en el uso de antibióticos que no siempre son exitosas. Por esta razón, es necesario investigar tratamientos alternativos contra la infección por *H. pylori*. Diversas investigaciones muestran que constituyentes de *Vitis vinifera* y del vino tendrían efecto sobre la bacteria.

El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*, como microorganismo control dados los diversos estudios que afirman que los polifenoles presentes en el vino tendrían efecto anti-*Escherichia coli*.

La metodología consistió en cultivar las bacterias en medio líquido o en medio sólido, suplementados con rangos de dosis de ácido gálico y/o catequina. La actividad antibacteriana de los polifenoles en medio líquido se evaluó midiendo la DO₆₀₀ de los cultivos y contabilizando las CFU/mL. Además, se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de las bacterias en medios sólidos, suplementados con los polifenoles en forma individual o en conjunto. También se evaluó la cinética de inhibición por parte de estos compuestos sobre el crecimiento bacteriano.

Los resultados indican que tanto ácido gálico como catequina presentan actividad bactericida sobre ambas bacterias, siendo más efectivo el ácido gálico (el cual inhibe el crecimiento con concentraciones, dosis y tiempos de exposición menores que la catequina). La bacteria más sensible a los dos polifenoles es *H. pylori*. El efecto sinérgico resultó ser variable, relacionado fuertemente con las dosis de ácido gálico y catequina.

PALABRAS CLAVES

Bacterias Gram negativa, compuestos fenólicos, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

The purpose of this work was to study the antibacterial effect of gallic acid and catechin on *H. pylori* using *E. coli* as a control microorganism because various studies suggest that wine polyphenols show anti-*Escherichia coli* effects. The methodology consisted in growing bacteria in liquid (Trypticase soy broth or Luria Bertani) or agar (Trypticase soy agar or Luria Bertani agar) media. The culture media were supplemented with increasing doses of gallic acid and/or catechin, to generate the various conditions. In liquid medium, OD₆₀₀ and CFU/mL were scored. In addition, diameters of the halo of growth inhibition produced by the two compounds either individually or together were also measured. Finally, both compounds were also determined kinetics of inhibition of bacterial growth. The results indicate that both polyphenols have antibacterial activity on both bacteria and that gallic acid is more effective, because inhibits growth at concentrations, doses and times less than catechin. *H. pylori* was most sensitive bacteria to both polyphenols and the synergistic effect between both polyphenols was observed but it was strongly depend upon doses of gallic acid and catechin.

KEY WORDS

Gram negative bacteria, phenolic compounds, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son un grupo de compuestos generados a partir del metabolismo secundario de los vegetales (Rodríguez *et al.*, 2005). Se caracterizan por poseer al menos un anillo bencénico y uno o varios grupos hidroxilos (Cheynier *et al.*, 2003). Según Cheynier *et al.* (2003), los polifenoles se clasifican fundamentalmente en compuestos no flavonoides, entre los que se encuentra el ácido gálico y flavonoides, entre los que podemos mencionar a la catequina. Los últimos se diferencian en que tienen un esqueleto C6-C3-C6.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las más importantes características relacionados con los alimentos, entre ellos la uva y el vino. La importancia de estos compuestos se debe a su estrecha relación con las características sensoriales de los alimentos tales como el color, astringencia, amargor y aromas (Monagas *et al.*, 2005, Obrequé-Slier *et al.*, 2010). Asimismo, se ha observado que cumplen un rol biológico en la protección y mantención de las diferentes especies de plantas (Iwasaki *et al.*, 2004). Diversos estudios, señalan que estos compuestos poseen un amplio número de efectos en la salud, entre los que se mencionan las actividades antioxidante, antialérgica, anticancerígena, antiinflamatoria y antimicrobiana (Hertog *et al.*, 1995 y Middleton *et al.*, 2000). La actividad antimicrobiana de los polifenoles consiste en inhibir el crecimiento de algunas bacterias con incidencia sobre la salud, tales como *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* (O'Gara *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008)

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa de forma bacilar espiralada, microaerofílica, flagelada, neutrófila, que habita en la capa mucosa que recubre el epitelio del estómago humano, de muy lento crecimiento. Inicialmente, fue clasificada dentro del género *Campylobacter*. Sin embargo, en 1989 esta bacteria se agrupó de forma separada en el género *Helicobacter* (Goodwing *et al.*, 1989; Yamaoka, 2008).

Se ha calculado que el 50% de la población mundial está infectada con esta bacteria (Yamaoka, 2008). Asimismo, se estima que en Chile al menos el 73% de la población es portadora del microorganismo, siendo la mayoría de los pacientes asintomáticos (Ruggiero *et al.*, 2007). Tombola *et al.* (2003) han señalado que el contagio con *H. pylori* constituye el mayor factor de riesgo para desarrollar gastritis, úlcera péptica, linfomas asociados al tejido de la mucosa linfóide y cáncer gástrico. Es importante mencionar que el cáncer gástrico en humanos es el segundo cáncer en prevalencia a nivel mundial. Por otra parte, se ha estimado que *H. pylori* aumenta 10 veces la probabilidad de contraer esta enfermedad, y por esto la Agencia de Investigación del Cáncer (IRAC), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la clasificó como un agente cancerígeno de tipo I (Yamaoka, 2008). Según Shin *et al.*, (2005), el daño que esta especie produce en el estómago estaría dado por la producción de ureasa y de la toxina vacuolizante VacA. La ureasa es una enzima que hidroliza la urea produciendo CO₂ y amonio.

Las terapias de erradicación de la bacteria que hoy se emplean en el mundo involucran el uso de un inhibidor de la bomba de protones o bismuto y dos antibióticos, que pueden ser

amoxicilina, tetraciclina, metronidazol o claritromicina (Howden y Hunt, 1998; Bonacorsi *et al.*, 2009). Sin embargo, la erradicación de la bacteria no es siempre exitosa debido a la resistencia adquirida a los antibióticos, por algunas poblaciones de bacterias (Glupczynski, 1998). Esto produce limitaciones a la elección de terapias especialmente en países en desarrollo, como Nigeria en donde la resistencia puede alcanzar al 100% como en el caso de metronidazol (Aboderin *et al.*, 2007). Otros factores que influyen en el éxito de la terapia son la falta de rigurosidad para completar el tratamiento por parte de los pacientes, los efectos no deseados producidos por el tratamiento, el costo de las terapias y la falta de disponibilidad de las drogas en determinadas áreas geográficas. Esto crea la necesidad de investigar tratamientos alternativos contra la infección por *Helicobacter pylori* (Bonacorsi *et al.*, 2009).

Diversos estudios han demostrado que polifenoles provenientes de diferentes alimentos tienen actividad anti-*Helicobacter pylori*. O'Gara *et al.* (2000) demostraron que los polifenoles derivados del ajo tienen efecto antibacteriano sobre *Helicobacter pylori*. Similares resultados fueron obtenidos por Vatterm *et al.* (2005), usando extractos de jugo de zarzaparrilla, arándano y uva, y por Mabe *et al.* (1999), utilizando extractos de té verde. Romero *et al.* (2007) mencionan que con bajas dosis de extracto de aceite de oliva virgen, también se obtiene una respuesta antibacteriana sobre este microorganismo. Algunos estudios muestran que compuestos provenientes de extractos de vino tinto, como el resveratrol, tienen actividad anti-*H. pylori* (Mahady *et al.*, 2003). Brown *et al.* (2009) menciona que, además del resveratrol, el ácido elágico tendría un efecto sobre la proliferación de *H. pylori*. Recientemente, Tombola *et al.* (2003) y Yahiro *et al.* (2005) reportaron que polifenoles del vino tinto como quercetina, epigallocatequina y ácido elágico, entre otros, inhiben potencialmente la formación del canal iónico y la vacuolización celular producida por *H. pylori* en células de tejido gástrico.

Por otro lado, se ha observado que los polifenoles afectan el crecimiento de otras bacterias de importancia, como *Escherichia coli*. Esta bacteria es uno de los microorganismos más estudiados, habitante frecuente del intestino de los mamíferos (Yoon *et al.*, 2009). *E. coli* es una bacteria bacilar, Gram negativa, flagelada, anaeróbica facultativa capaz de fermentar o bien de suplir sus necesidades mediante un metabolismo aeróbico. Las infecciones más comunes por *E. coli* ocurren en el tracto gastrointestinal, debido a la facilidad de acceso del patógeno mediante alimentos o bebidas. La incidencia de tales infecciones depende de la higiene personal y alimenticia, además de la temperatura del medio (Sussman, 1997).

Diversos estudios han demostrado que los polifenoles derivados de zarzaparrilla como las proantocianidinas, afectan la viabilidad de *Escherichia coli* (Eydelnant y Tufenkji, 2008). Otros estudios mencionan que los compuestos fenólicos no flavonoides, como ácido vainillínico, ácido protocatéquico, ácido gálico y ácido cafeico, y flavonoides, como catequina, quercetina y rutina, tienen efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* (Rodríguez *et al.*, 2007). De acuerdo a Smith *et al.* (2003), los taninos condensados provenientes de quebracho tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* en condiciones aeróbicas.

Dentro de la composición global de los compuestos fenólicos, el ácido gálico y la (+)-

catequina son representantes importantes de los polifenoles presentes en hollejos y semillas de bayas de *Vitis vinifera* (Obreque-Slier et al., 2010b). Según Ghiselli *et al.* (1998) el ácido gálico se encuentra en el vino tinto en concentraciones cercanas a 320 mg/L, lo que representa alrededor de un 65% del total de los ácidos fenólicos (Manach *et al.*, 2005). Por otro lado, la catequina se encontraría en concentraciones cercanas a los 145 mg/L en el vino tinto (Ghiselli *et al.*, 1998), lo que corresponde al compuesto flavonoide con mayor concentración en vino tinto. Se ha estimado que el consumo diario de catequinas es del orden de 18-50 mg que provienen principalmente del consumo de frutas y vino tinto (Manach *et al.*, 2005).

A pesar de la importancia atribuida a estos compuestos para la salud humana, el efecto antimicrobiano del ácido gálico y la catequina sobre *H. pylori* y *E. coli* ha sido escasamente estudiado. Por lo señalado, que para este estudio se propone el siguiente objetivo.

Objetivo

Evaluar en laboratorio el efecto antibacteriano del ácido gálico y la catequina, sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Microbiología Molecular perteneciente al Programa de Biología Celular y Molecular, del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Materiales

Materiales y reactivos

Merk Ltda (Santiago, Chile). Material de vidrio y productos químicos grado proanálisis.

Sigma-Aldrich (Santiago, Chile). Ácido gálico y catequina.

Asahi Glass (Tokio, Japón). Filtros de acetato de celulosa

J.T. Baker (México). Cloruro de sodio y bacto agar.

Becton and Dickison (Nueva Jersey, EE.UU.). Bacto triptona, caldo de soya triptona y agar soya triptona.

Winkler (Santiago, Chile). Dimetilsulfóxido (DMSO).

Thermo Scientific HyClone (Utah, EE.UU.). Suero de caballo.

Oxoid (Hampshire, Inglaterra). Suplementos Dent y Vitox.

Gibco BRL (Maryland, EE.UU.). Amortiguador fosfato-salino pH 7,2 (PBS).

Equipamiento

Incubadora de atmósfera controlada. Marca Shel Lab.

Agitador. Modelo PSU-10i, marca Biosan.

Incubadora con agitación orbital. Marca Labtech modelo LSI-3016R.

Incubadora sin control de atmósfera. Marca Shel Lab, modelo IR2424.

Agitador MiniTwist. Marca Select BioProducts.

Freezer. Marca Labtech modelo LDF-9007.

Espectrofotómetro. Marca Metertek modelo SP-830.

Cepas Bacterianas

Para este estudio se utilizaron las cepas de *H. pylori* 26695 y ATCC43504, y la cepa de *E. coli* JM109, provenientes del laboratorio anteriormente mencionado.

Medios de cultivo

Caldo de Soya Triptona (TSB). 30 g/L de caldo de soya tripticasa (TSB), suplementado con 50 mL/L de suero de caballo, 10 mL/L de Vitox y 4 mL/L de suplemento antibiótico Dent (Mobley y Foxall, 1997).

Agar Soya Triptona (TSA). 40 g/L de Agar soya tripticasa (TSA), suplementado con 50 mL/L de suero de caballo, 10 mL/L de Vitox y 4 mL/L de suplemento antibiótico Dent (Mobley y Foxall, 1997).

Caldo Luria-Bertani (LB). 10 g/L de Bacto Triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl (Sambrook *et al.*, 1989).

Agar Luria-Bertani (LB agar). 10 g/L de Bacto Triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl y 15 g/L de Bacto Agar (Sambrook *et al.*, 1989).

Métodos

Diseño de experimentos

El efecto del ácido gálico o catequina sobre el crecimiento de cada una de las cepas bacterianas fue evaluado mediante 9 ensayos independientes. De la misma manera, a través de 6 ensayos independientes se estudió el efecto en conjunto de ambos compuestos por cada cepa bacteriana. Los ensayos se realizaron en duplicado y se repitieron 3 veces.

La unidad experimental para los ensayos de la actividad antibacteriana en medio líquido y efecto del tiempo de exposición de los compuestos sobre la viabilidad de las bacterias fue el medio de cultivo líquido (TSB o LB) y un número definido de CFU/mL de la respectiva bacteria.

Para la medición de los halos de inhibición del crecimiento, la unidad experimental era el medio sólido (TSA o LB agar) y un número definido de unidades formadoras de colonias por volumen definido (CFU/mL) de la respectiva bacteria.

Procedimientos

Cultivo de bacterias. *H. pylori* se cultivó en medio TSA, bajo condiciones microaerófilas (5% CO₂ y 70% de humedad relativa) a 37°C, durante 48 horas, en placas Petri de 90x14 mm. Una vez crecido los cultivos, las bacterias fueron colectadas raspando la placa con un asa metálica y resuspendiéndolas en 300 µL de amortiguador fosfato-salino pH 7,2 (PBS: 2,1 g/L KH₂PO₄, 90 g/L NaCl, 7,26 mg/L Na₂HPO₄x7H₂O) para posteriormente ser sembradas y sometidas al estudio. Para la preservación, las bacterias se suspendieron en 300 µL de TSB suplementado con glicerol 20% v/v, según lo descrito por Mobley y Foxall

(1997) (Figura 1).

Por su parte, *E. coli* se cultivó en 5 mL de medio líquido LB, a 37°C por 24 h con agitación constante de 200 rpm de acuerdo a lo descrito por Sambrook *et al.* (1989) (Figura 1).

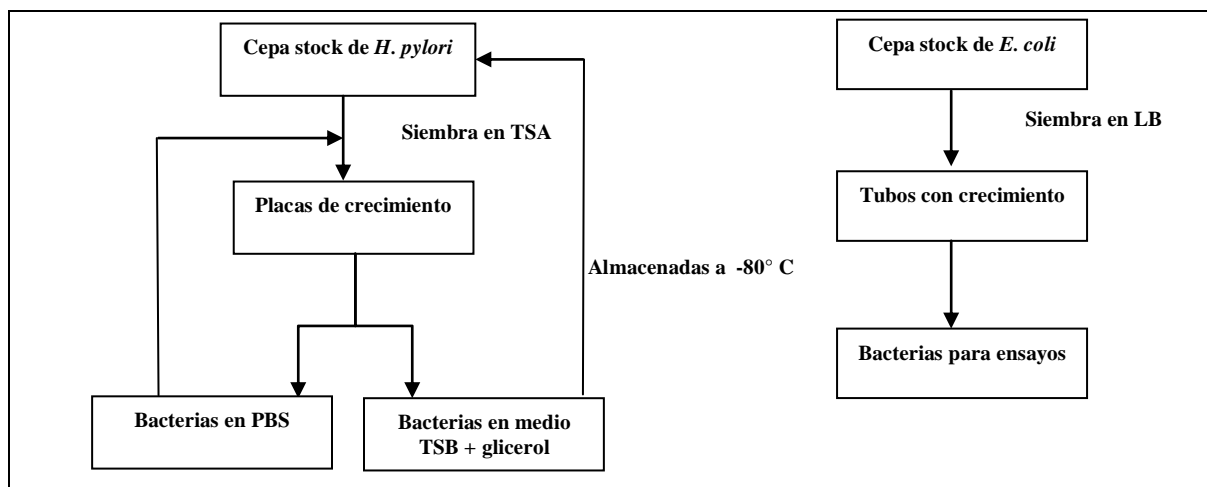


Figura 1. Diagrama de cultivos de *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*.

Preparación de solución stock de ácido gálico o catequina. Las soluciones se prepararon diluyendo 50 mg de los compuestos en 1 mL de DMSO 10% en PBS (Castillo *et al.*, 2009). Posteriormente las soluciones se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros de membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm de porosidad y 25 mm de diámetro.

Ensayo de la actividad antibacteriana sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*, en medio líquido. En tubos de ensayo con 5 mL de medio TSB, se inoculó 3×10^7 células/mL de *H. pylori*. Cantidades crecientes de las diferentes soluciones de ácido gálico o catequina fueron colocadas seriadamente en los tubos sembrados y se incubaron con agitación constante a 250 rpm bajo condiciones microaerófilas (5% CO₂ y 70% de humedad relativa) a 37°C por 48 horas. Luego en una alícuota del medio se determinó el nivel de turbidez a una longitud de onda de 600 nm (DO₆₀₀) (Stevens *et al.*, 1991) (Figura 2).

En el caso de *E. coli*, los cultivos se realizaron en 5 mL de medio LB. Después de colocar los diferentes compuestos, los tubos se incubaron a 37 °C con agitación a 250 rpm por 24 horas. El crecimiento bacteriano se relacionó con la medición espectrofotométrica de una alícuota de 1 mL del medio a una longitud de onda de 600 nm (Figura 2) (Stevens *et al.*, 1991).

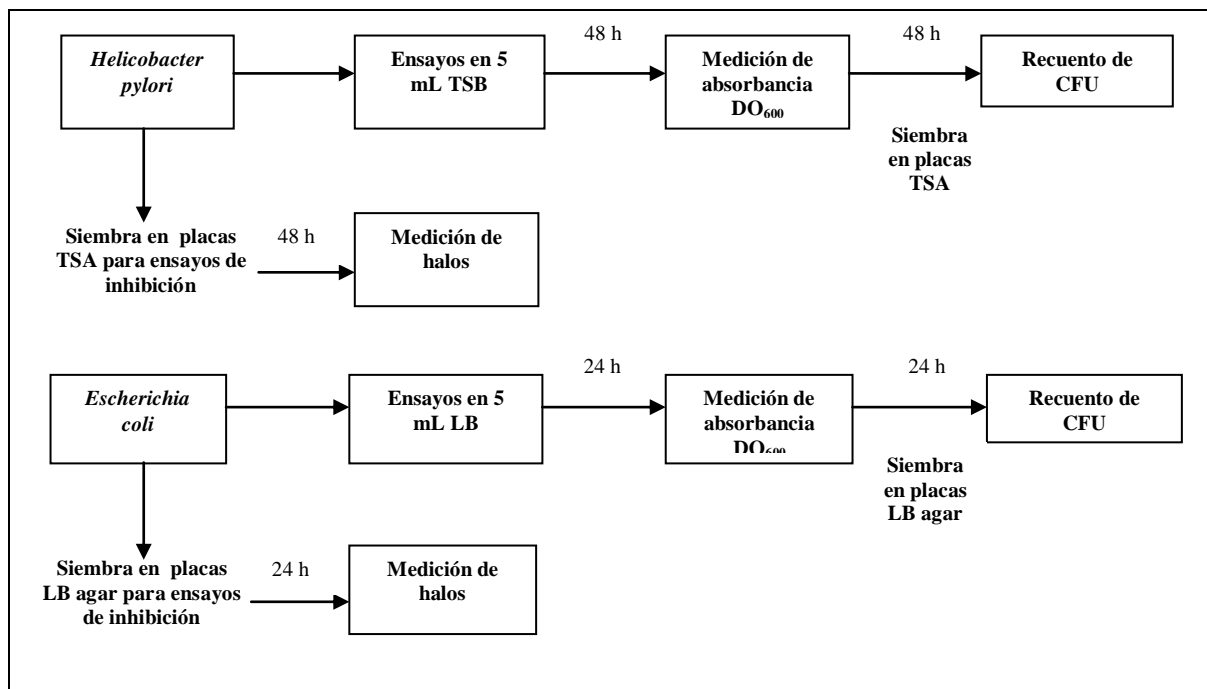


Figura 2. Diagrama de flujo de procedimientos.

La actividad del ácido gálico o catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* en medio líquido, fue evaluada con concentraciones seriadas y crecientes de cada compuesto fenólico, tal como se puede observar en el cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos para el evaluar efecto antibacteriano de ácido gálico o catequina en medio líquido, sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*.

Tratamiento	<i>Helicobacter pylori</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	Ácido gálico	Catequina	Ácido gálico	Catequina
	mg/mL			
T0	0,0	0,0	0,0	0,0
T1	0,2	0,2	0,2	0,5
T2	0,4	0,4	0,4	1,0
T3	0,6	0,6	0,6	1,5
T4	0,8	0,8	0,8	2,0
T5	1,0	1,0	1,0	2,5
T6	-	-	1,5	3,0
T7	-	-	2,0	3,5
T8	-	-	2,5	4,0
T9	-	-	3,0	2,5
T10	-	-	3,5	5,0
T11	-	-	4,0	-
T12	-	-	4,5	-

Prueba de viabilidad de las células. Cada uno de los tubos del ensayo anteriormente descritos, se extrajeron 100 μL y se hicieron 6 diluciones seriadas, en PBS 1x. Luego alícuotas de 100 ó 10 μL se sembraron en placas de agar TSA o LB, según corresponda, y se incubaron durante 48 (*H. pylori*) o 24 horas (*E. coli*), se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonia por mL de medio cultivo (CFU/mL) (Figura 2). (Eydelnant y Tufenkji, 2008)

Cinética de inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas. En este caso, se utilizó la metodología propuesta por Romero *et. al* (2007) con algunas modificaciones. En tubos Eppendorf con 1 mL de medio TSB o caldo LB, dependiendo de la bacteria, se inoculó 3×10^7 CFU/mL de la bacteria correspondiente y luego se agregó la concentración más alta de ácido gálico o catequina utilizada en las pruebas en medio líquido. De la mezcla anterior, se extrajeron 100 μL (*H. pylori*) o 10 μL (*E. coli*) a los 0, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos, para determinar el número de células viables después del tratamiento. Las CFU/mL se contabilizaron como se indicó anteriormente.

Determinación del halo de inhibición de crecimiento. De acuerdo a la metodología propuesta por Rodríguez *et al.* (2007), previo a la inoculación, se realizaron pocillos de 3 mm de diámetro en las placas de cultivo TSA y LB. En las placas TSA se sembraron 100 μL de inóculo de *H. pylori* que contenían 3×10^7 células/mL el que fue esparcido homogéneamente con un asa metálica, recorriendo la placa en tres direcciones. Por otra parte, en cada uno de los pocillos se depositaron diferentes dosis de los compuestos a ensayar en forma individual o mezclados. Luego de 48 horas de incubación se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento formado en torno a cada pocillo.

En el caso de *E. coli*, el procedimiento fue similar, excepto que las placas con medio LB fueron sembradas con 10 μL de inóculo diluido en 90 μL de PBS 1x que contenía 3×10^7 células/mL. Las placas fueron incubadas por 24 horas antes de medir el halo de inhibición (Figura 2).

Las actividades inhibitorias del ácido gálico o catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* en medio sólido, fueron evaluadas con dosis seriadas y crecientes de cada compuesto fenólico, como se puede observar en el cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos para evaluar el efecto antibacteriano de ácido gálico y catequina en medio sólido sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*.

Tratamiento	<i>Helicobacter pylori</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	Ácido gálico	Catequina	Ácido gálico	Catequina
	mg/pocillo			
T0	0,0	0,0	0,0	0,0
T1	0,2	0,2	0,5	5,0
T2	0,4	0,4	1,0	7,5
T3	0,6	0,6	1,5	10,0
T4	0,8	0,8	2,0	12,5
T5	1,0	1,0	2,5	15,0

Estudio de la acción sinérgica de ácido gálico y catequina. El efecto sinérgico de ácido gálico y catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* fue evaluado mediante ensayos de medio sólido. Los ensayos de viabilidad con *Helicobacter pylori* se realizaron manteniendo inicialmente la dosis de ácido gálico constante y la de catequina variable para, secundariamente, evaluar el efecto de la dosis de catequina constante con dosis crecientes de ácido gálico (Cuadro 3). Los ensayos de viabilidad con *Escherichia coli* fueron realizados en condiciones similares (Cuadro 4).

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para evaluar el efecto sinérgico del ácido gálico y de la catequina sobre la viabilidad de *Helicobacter pylori*.

Tratamiento	Dosis			
	Ácido gálico	Catequina	Ácido gálico	Catequina
	mg			
T0	0,2	0,0	0,00	0,4
T1	0,2	0,1	0,05	0,4
T2	0,2	0,2	0,10	0,4
T3	0,2	0,4	0,20	0,4
T4	0,2	0,6	0,25	0,4
T5	0,2	0,8	0,40	0,4

Cuadro 4. Tratamientos utilizados para evaluar el efecto sinérgico del ácido gálico y de la catequina sobre la viabilidad de *Escherichia coli*.

Tratamiento	Dosis			
	Ácido gálico	Catequina	Ácido gálico	Catequina
	<i>mg</i>			
T0	0,5	0,00	0,00	7,5
T1	0,5	2,50	0,10	7,5
T2	0,5	5,00	0,25	7,5
T3	0,5	7,50	0,50	7,5
T4	0,5	10,0	0,75	7,5
T5	0,5	12,5	1,00	7,5

Variables a medir

Grado de turbidez. Mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm, de acuerdo a lo propuesto por Stevens *et al.* (1991).

Cantidad de unidades formadoras de colonias. Mediante la siembra de diluciones seriadas en medio sólido (Eydelnant y Tufenkji, 2008).

Diámetro del halo de inhibición. Mediante la metodología propuesta por Rodríguez *et al.* (2007).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de Tuckey para evaluar las diferencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antibacteriana del ácido gálico

Ensayo de la actividad antibacteriana sobre *H. pylori* y *E. coli*.

Con el propósito de determinar el efecto antibacteriano del ácido gálico sobre *E. coli*, la bacteria se creció en medio LB suplementado con diferentes concentraciones de ácido gálico por 24 h (Cuadro1). Después del tiempo de incubación, se midió la densidad óptica a los distintos cultivos y se determinó las CFU/mL. Como se muestra en la Figura 3, la densidad óptica resultante de estos tratamientos después de 24 h de incubación varió entre valores cercanos o menores a 1,00, DO_{600} en el tratamiento control, y 0,00, DO_{600} en los tratamientos con concentraciones de ácido gálico superiores a 3,5 mg/mL, ($p < 0,05$). Asimismo, se observó que concentraciones superiores a 2,5 mg/mL de ácido gálico producen un efecto inhibitorio en el crecimiento de *E. coli*. La determinación de la densidad óptica de los cultivos como una medida para evidenciar el efecto antibacteriano de ácido gálico fue validada por la medición de las CFU/mL, parámetro que permite determinar la cantidad de bacterias vivas remanentes. Así, se observó que cantidades mayores a 3.0 mg/mL de ácido gálico producen una evidente reducción de la cantidad de bacterias vivas. Estos datos sugieren fuertemente que el ácido gálico tiene un efecto bactericida sobre *E. coli*.

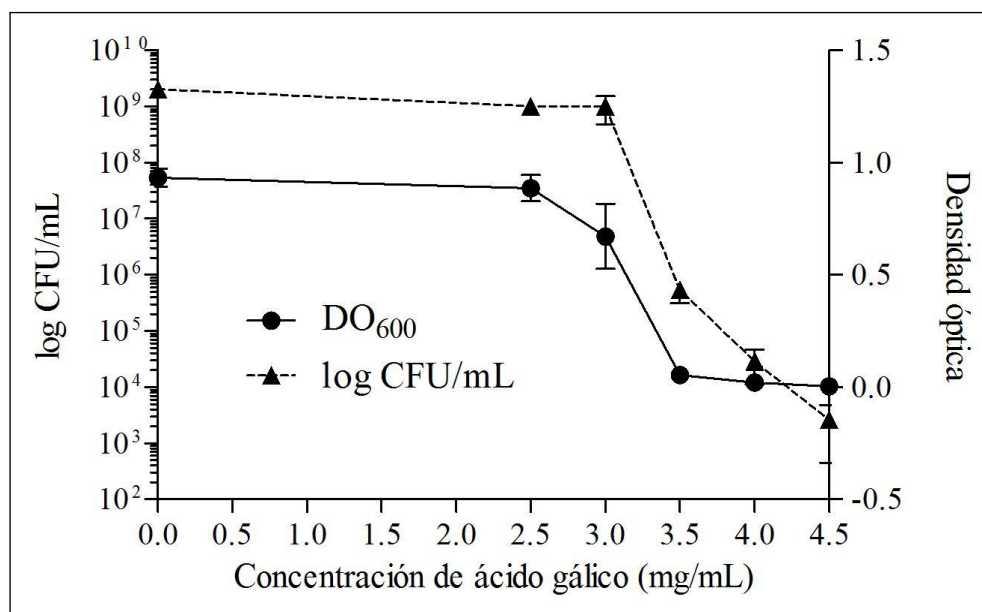


Figura 3. Valores de la DO_{600} y de CFU/mL de *Escherichia coli*

En el caso de *H. pylori*, la bacteria se creció en caldo soya triptona por 48 h suplementado con concentraciones crecientes de ácido gálico (Cuadro 1). Después de este período de incubación, se midió tanto la densidad óptica como el parámetro CFU/mL para determinar la sobrevivencia de la bacteria (Figura 4). Al determinar el CFU/mL, se observó un efecto antibacteriano de ácido gálico sobre *H. pylori* (Figura 4). Entre los resultados que se obtuvieron existían diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$), siendo el efecto del ácido gálico muy evidente a concentraciones superiores a 0,6 mg/mL, confirmándose el efecto bactericida del polifenol. Otro hecho relevante, es que no se observó diferencias en la sensibilidad frente a la droga entre las dos cepas de *H. pylori* estudiadas ($p > 0,05$).

Sin embargo, este fenómeno no se pudo determinar midiendo la densidad óptica de los cultivos, tal como con *E. coli*. Este aumento de la DO_{600} también se observó en condiciones de ausencia de la bacteria, por lo que probablemente el ácido gálico, en el tiempo del tratamiento, sufre algún tipo de reacción con los componentes del medio de cultivo que cambia la absorbancia y crea un falso negativo en relación al efecto antibacteriano del ácido gálico. Por esta razón el efecto antibacteriano de la droga sobre *H. pylori* se determinó midiendo la sobrevivencia de la bacteria.

Al comparar los resultados obtenidos con *E. coli* y *H. pylori* se observa que *H. pylori* es 10 veces más sensible al tratamiento con ácido gálico. Por lo que concluimos que ácido gálico, tiene un efecto antibacteriano diferencial dependiendo del microorganismo que se ensaye. Estos resultados son coincidentes con los estudios de Rodríguez *et al.* (2005).

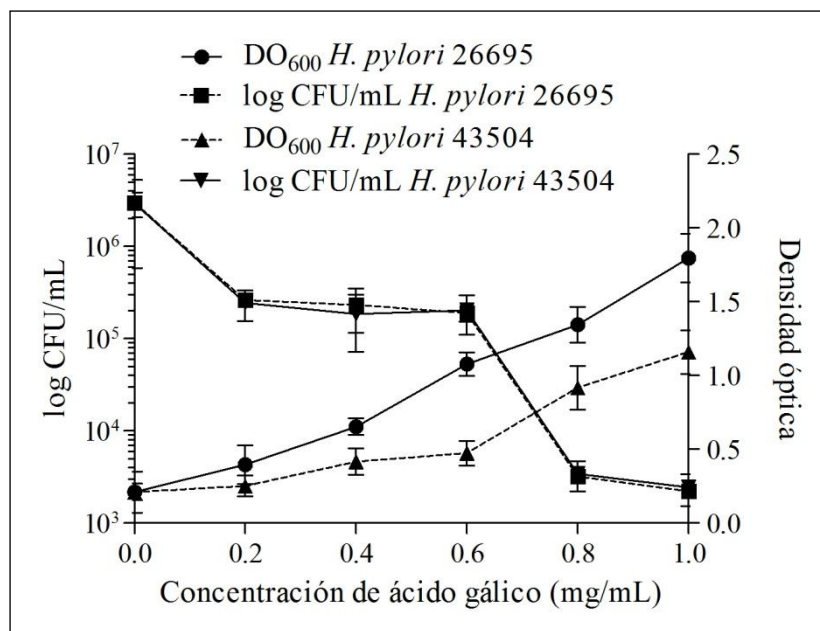


Figura 4. Valores de la DO_{600} y de CFU/mL de *Helicobacter pylori*

Determinación del halo de inhibición en el crecimiento bacteriano.

Para determinar el efecto antibacteriano del ácido gálico mediante la medición del halo de inhibición del crecimiento de *E. coli*, se sembró la bacteria en medio LB agar y se aplicaron diferentes dosis de ácido gálico previo a la incubación de la bacteria por 24 horas (Cuadro 2). Después del tiempo de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición que se generaron. Como se puede observar en la Figura 5, el diámetro de los halos de inhibición varió entre los 0 mm (en el tratamiento control y 0,5 mg) y 12 mm (con una dosis de 2,5 mg). Con dosis iguales o superiores a 1 mg ($p < 0,05$), se observaron halos de inhibición del crecimiento de la bacteria.

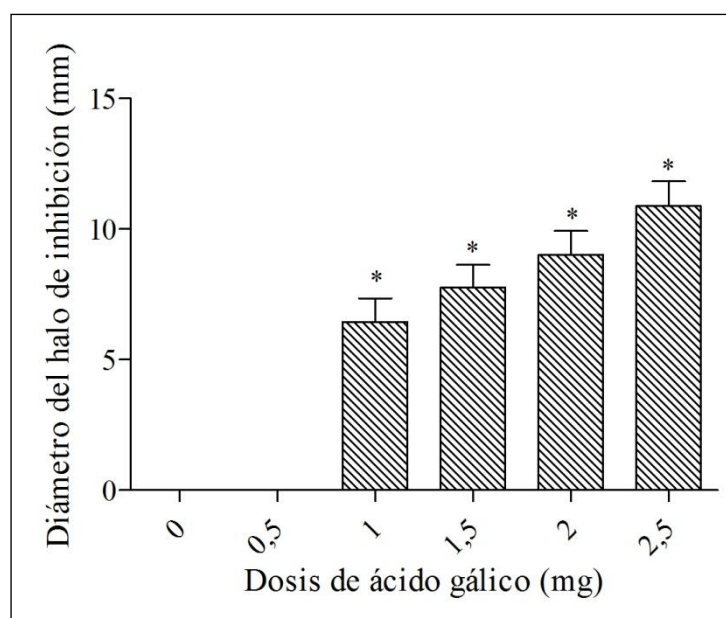


Figura 5. Diámetro de los halos de inhibición de crecimiento del cultivo de *E. coli*. * Indica diferencias estadísticamente significativas en relación con el tratamiento con 0 mg de ácido gálico ($p < 0,05$).

Para determinar el efecto antibacteriano del ácido gálico sobre *H. pylori*, se sembró la bacteria en medio TSA y tras aplicar diferentes dosis de ácido gálico (Cuadro 2), se incubaron las bacterias por 48 horas, para luego medir el halo de inhibición. Como se observa en la figura 6, el diámetro de los halos de inhibición varió entre 0 (tratamiento control) y 15 mm (con una dosis de 1 mg). Se generaron halos con dosis iguales o superiores a 0,2 mg de la droga ($p < 0,5$). En estos ensayos, no se detectan diferencias en las sensibilidades entre las dos cepas de *H. pylori* ($p < 0,05$).

Al comparar los resultados obtenidos con *E. coli* y los observados con *H. pylori*, nuevamente se pudo constatar que *H. pylori* es casi 5 veces más sensible al ácido gálico que *E. coli*.

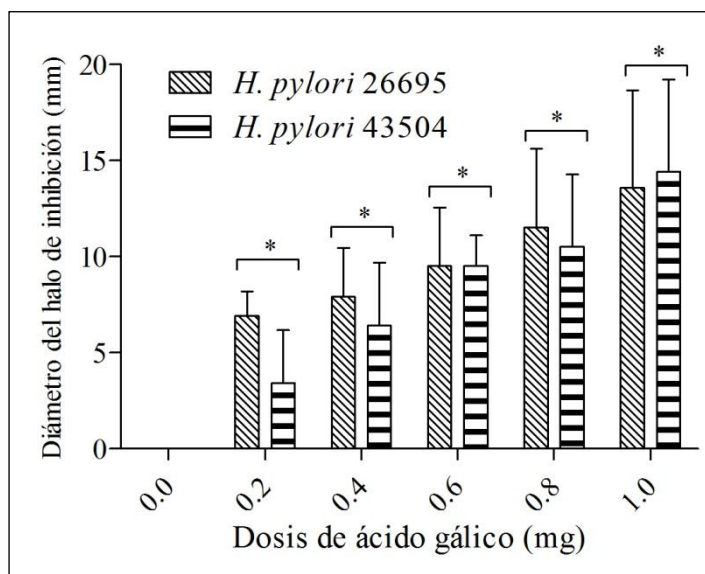


Figura 6. Diámetro de los halos de inhibición de crecimiento del cultivo de *H. pylori*. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas en relación con el tratamiento con 0 mg de ácido gálico ($p < 0,05$).

Cinética de la inhibición del crecimiento bacteriano.

Con la finalidad de determinar la cinética de inhibición del crecimiento en presencia de ácido gálico, se expuso a *E. coli* a la concentración más alta de este polifenol, con la que se había observado el efecto antibacteriano en los ensayos anteriores (4,5 mg/mL) en medio LB. Luego, a diferentes tiempos, desde el cultivo se extrajeron alícuotas para determinar el número de colonias sobrevivientes y se sembró en medio LB agar utilizando la técnica de diluciones seriadas. Después de incubar por 24 h, se contabilizó el número de CFU/mL. Como se observa en la Figura 7, el número de unidades formadoras de colonias varió desde 6×10^8 CFU/mL (tiempo 0) a 3×10^3 (a los 360 minutos). El efecto antibacteriano del ácido gálico fue significativo a partir de los 90 minutos ($p < 0,05$).

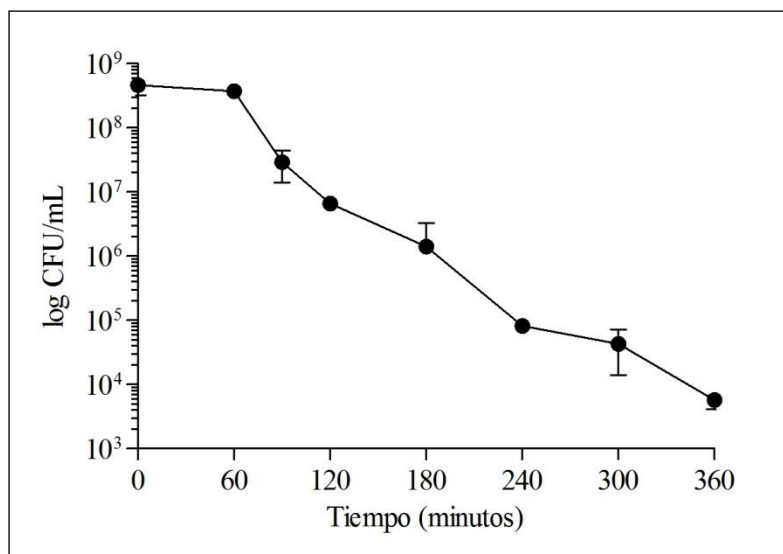


Figura 7. Cinética de inhibición del crecimiento de *E. coli* por el ácido gálico, mediante el recuento de CFU/mL a diferentes tiempos.

Para determinar la cinética de inhibición del crecimiento sobre *H. pylori*, la bacteria se expuso a una concentración de 1 mg/mL de ácido gálico, en medio TSB. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas que fueron sembradas en medio TSA mediante diluciones seriadas. Luego de 48 horas de incubación se contabilizó el número de CFU en las placas. Como se observa en la Figura 8, el número de unidades formadoras de colonias, varió entre los 2×10^6 (cepa 26695) y 2×10^7 (cepa 43504) CFU/mL en el tiempo inicial y 0 CFU/mL (cepa 43504) y $6,2 \times 10^1$ CFU/mL (cepa 26695) a los 90 minutos. Del mismo modo la actividad antibacteriana del ácido gálico ($p < 0,05$) comenzó a ser observada desde los 30 minutos de incubación.

Las dos cepas de *H. pylori* no presentaron diferencias significativas en sus sensibilidades a ácido gálico ($p < 0,05$) en los tiempo evaluados. Nuevamente, se observó que *H. pylori* fue más sensible que *E. coli* a la presencia de ácido gálico.

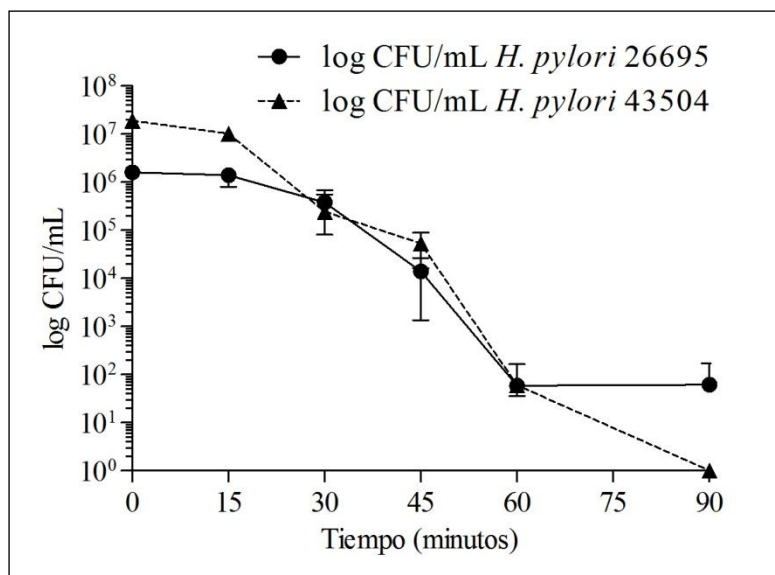


Figura 8. Cinética de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por el ácido gálico, mediante el recuento de CFU/mL a diferentes tiempos.

Actividad antibacteriana de la catequina

Ensayo de la actividad antibacteriana sobre *H. pylori* y *E. coli*.

Para determinar el efecto antibacteriano que tiene la catequina sobre *E. coli* se suplementó el medio LB con diferentes cantidades de catequina, incubándose por 24 horas (Cuadro 1). Después de esto, se midió la densidad óptica, para luego, extraer una alícuota de los diferentes cultivos y contabilizar las CFU/mL. En la Figura 9 se puede observar que la DO_{600} varió entre 0,9 (tratamiento control) y 0,8 (con una concentración de 5 mg/mL) no existiendo efecto de la catequina sobre la bacteria ($p > 0,05$). Al contabilizar el número de CFU/mL, se comprobó que cantidades crecientes de catequina no afectaron significativamente a *E. coli*. Es así como el inóculo inicial de 6×10^8 CFU/mL (tratamiento control) se mantuvo prácticamente invariable en el tiempo del ensayo. Esta observación sugeriría un efecto bacteriostático de la catequina sobre el crecimiento de *E. coli*.

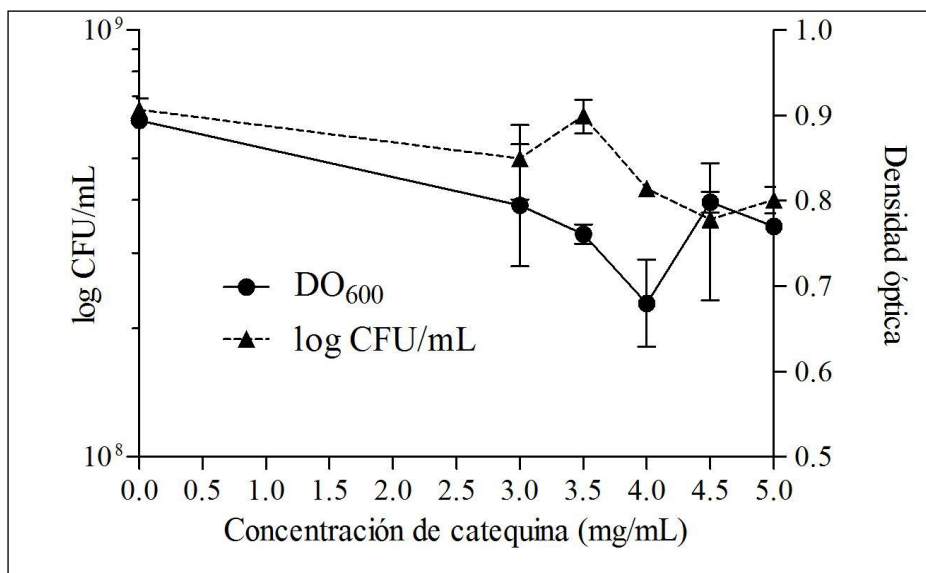


Figura 9. Valores de la DO₆₀₀ y de CFU/mL de *Escherichia coli*.

Por otra parte, para determinar el efecto de la catequina sobre *H. pylori*, se suplementó el medio TSB, con concentraciones crecientes de catequina (Cuadro 1). Tras 48 horas de incubación se midió la absorbancia a 600 nm y se extrajo una alícuota de los distintos cultivos para sembrar en medio TSA y contabilizar el número de CFU/mL viables resultantes de cada tratamiento. Como se puede observar en la Figura 10, la densidad óptica disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al control a partir de los 0,4 mg/mL. La DO₆₀₀ varió entre 0,15 Y 0,25 (tratamiento control) y 0 (con una concentración de 1 mg/mL). Esta medición fue concordante con el conteo de unidades formadoras de colonias, que variaron desde 5×10^7 (tratamiento control) a 0 CFU/mL a partir de 0,8 mg/mL de catequina.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la sensibilidad de las dos cepas de *Helicobacter pylori* estudiadas en presencia de catequina ($p > 0,05$).

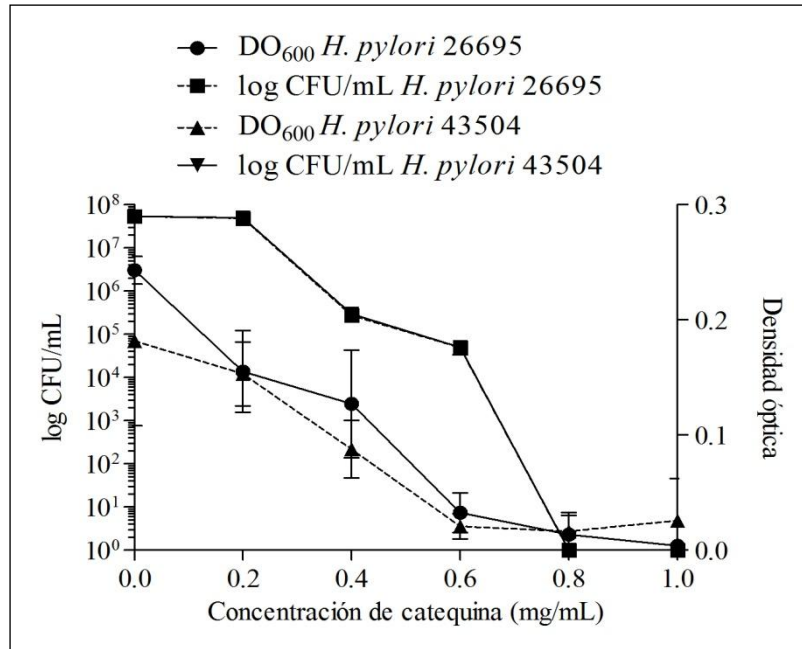


Figura 10. Valores de la DO₆₀₀ y de CFU/mL de *Helicobacter pylori*.

Determinación del halo de inhibición de crecimiento.

Para determinar el efecto se aplicaron diferentes cantidades del compuesto (Cuadro 2) a pocillos construidos en el medio LB agar. Tras incubación por 24 horas, se midió el diámetro de los halos de inhibición. En la Figura 11, se observa que el diámetro de los halos varió desde 0 mm (tratamiento control y 5 mg de catequina) hasta los 14 mm (15 mg de catequina). La aparición de halos de inhibición fue observada a partir de 7,5 mg de catequina ($p < 0,05$).

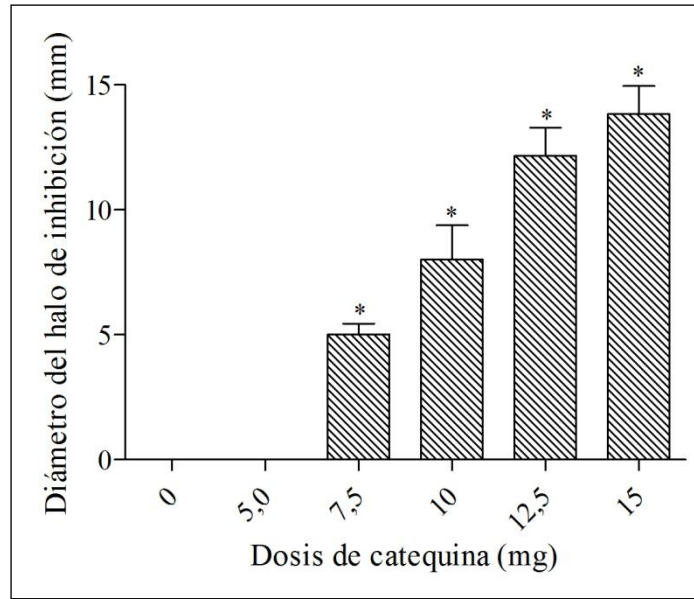


Figura 11. Medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento del cultivo de *E. coli*. (*) Indica diferencia estadísticamente significativa en relación con el tratamiento con 0 mg de catequina ($p < 0,05$).

Para determinar el efecto de catequina sobre *H. pylori*, la bacteria se sembró en medio TSB, en donde se aplicaron diferentes dosis de catequina, según lo indicado en el cuadro 2. Después de incubar la bacteria por 48 horas, se midió el diámetro de los halos de inhibición (Figura 12). Tal como lo indica la figura, los halos de inhibición se generan con dosis iguales o superiores a 0,4 mg de catequina ($p < 0,05$). Los diámetros de los halos, variaron entre 0 (tratamiento control y 0,2 mg de catequina) y 16 mm (1 mg de catequina), siendo mayores en la cepa 43504 de *H. pylori*. A pesar de lo anterior, sólo se observó diferencias significativas cuando las bacterias fueron sometidas a 1 mg de catequina ($p < 0,05$).

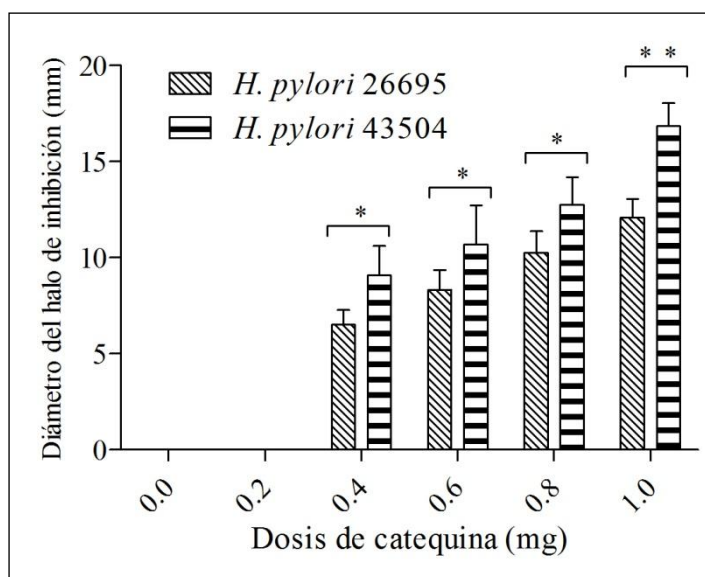


Figura 12. Medición del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento del cultivo de *H. pylori*. (*) Indica diferencia estadísticamente significativa en relación con el tratamiento con 0 mg de catequina ($p < 0,05$). (**) Indican diferencia estadísticamente significativa en relación con el tratamiento control y entre las dos cepas de *H. pylori*.

De esta manera, el crecimiento de *H. pylori* se inhibe con dosis casi 20 veces menores que las que se necesitan para inhibir el crecimiento de *E. coli*. Este resultado reitera lo descrito anteriormente en cuanto a que *H. pylori* es más sensible respecto del ácido gálico que *E. coli*.

Cinética de la inhibición del crecimiento bacteriano.

A diferencia de los ensayos que se realizaron con ácido gálico para determinar la cinética de inhibición del crecimiento bacteriano, éste se realizó solamente con las dos cepas de *H. pylori*, dado que las dosis para observar un efecto sobre *E. coli* eran muy altas. Para esto, se inoculó medio TSB con la bacteria y luego se agregó la mayor concentración de catequina con que se observó un efecto antibacteriano (1 mg/mL). Luego, se extrajo una alícuota a diferentes tiempos y se sembró en medio TSA. Luego de 48 horas de incubación se contabilizó el número de CFU/mL. Como se puede observar en la Figura 13, el número de células viables varió desde $3,5 \times 10^7$ a los 0 minutos a 5×10^2 CFU/mL a los 90 minutos. El número de CFU/mL comenzó a disminuir desde los 15 minutos ($p < 0,05$). En los tiempos utilizados no se observaron diferencias significativas entre la sensibilidad de las cepas de *H. pylori* a la catequina. ($p > 0,05$).

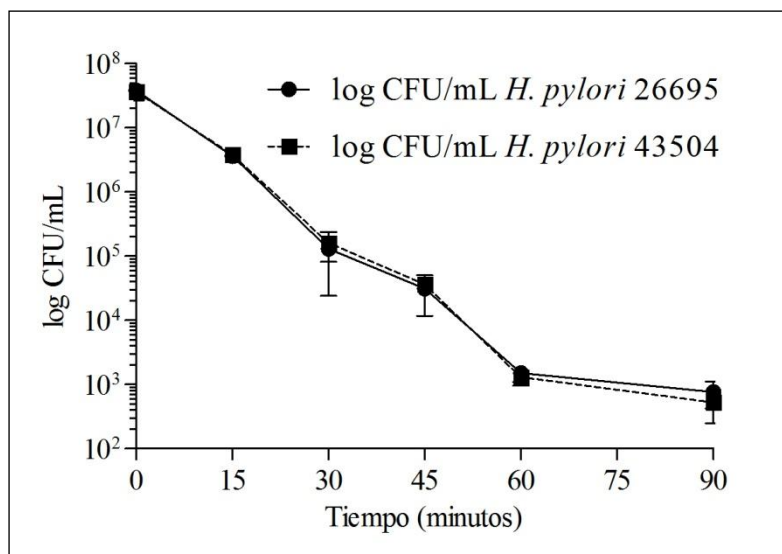


Figura 13. Efecto de la catequina sobre las dos cepas de *H. pylori* (CFU/mL).

Estudio de la acción sinérgica de ácido gálico y catequina.

Efecto antibacteriano del catequina en presencia de ácido gálico.

Con el fin de evaluar el efecto antibacteriano de catequina sobre *E. coli* en presencia de ácido gálico, se sembró la bacteria en medio LB agar y se aplicaron dosis crecientes de catequina en presencia de una dosis fija de ácido gálico (Cuadro 4). Luego de 24 horas de incubación se midió el diámetro del halo de inhibición (Figura 14). El diámetro de los halos de inhibición varió entre 0 en el tratamiento control y 7 mm (con 12,5 mg de catequina). El halo de inhibición comenzó a desarrollarse con una dosis igual o superior a 7,5 mg de catequina en presencia de 0,5 mg de ácido gálico ($p < 0,05$).

El diámetro de los halos de inhibición generados por los compuestos fenólicos en forma individual fue similar al que se produjo con la aplicación de los dos compuestos en conjunto ($p > 0,05$) o bien, mayor ($p < 0,05$) por lo que no existiría un efecto aditivo.

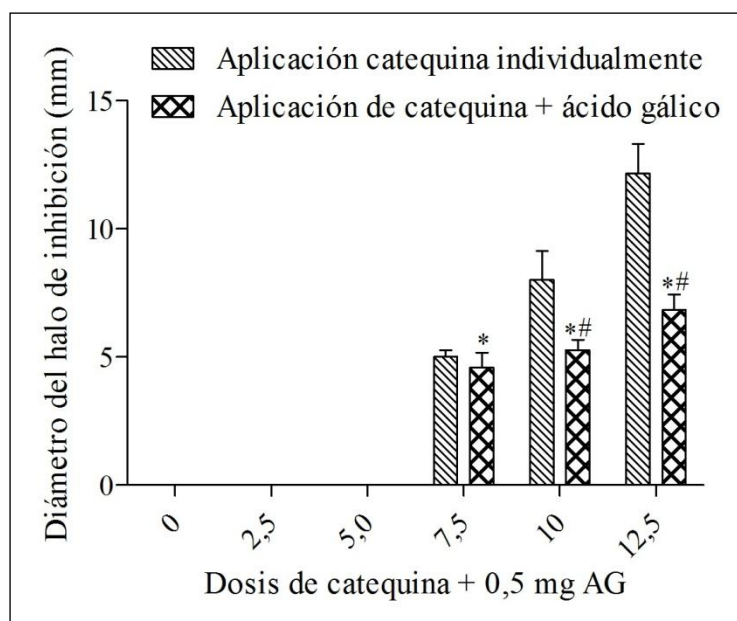


Figura 14. Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli*. La bacteria fue tratada con dosis crecientes de catequina + 0,5 mg de ácido gálico. (*) Indica una diferencia estadísticamente significativa en relación con el tratamiento con 0 mg de catequina + 0,5 mg de ácido gálico ($p < 0,05$). (#) Indica diferencia estadísticamente significativa entre la aplicación de forma individual de los polifenoles y la aplicación en conjunto de los dos compuestos.

Por otro lado, para evaluar el efecto antibacteriano de la catequina sobre *H. pylori* en presencia de ácido gálico, se sembró la bacteria en medio TSA y luego se agregaron dosis crecientes de catequina más una dosis constante de ácido gálico (Cuadro 3). Después de 48 horas de incubación se midió el diámetro del halo de inhibición (Figura 15 A y B).

Al aplicar individualmente la catequina, los diámetros de los halos de inhibición fueron observados a partir de los 0,25 mg de catequina (cepa 43504) y 0,4 mg de catequina (cepa 26695). Por su parte, cantidades individuales de 0,2 mg de ácido gálico originaron halos de inhibición de 3 mm (cepa 43504) y 7 mm (cepa 26695). Cuando los polifenoles fueron colocados en conjunto se observó un aumento del diámetro del halo de inhibición con respecto a los polifenoles colocados individualmente. Sin embargo, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con 0,1; 0,45 y 0,8 mg de catequina para la cepa 43504 mientras que para la cepa 26695 se observó un similar comportamiento con 0,1 y 0,25 mg de catequina.

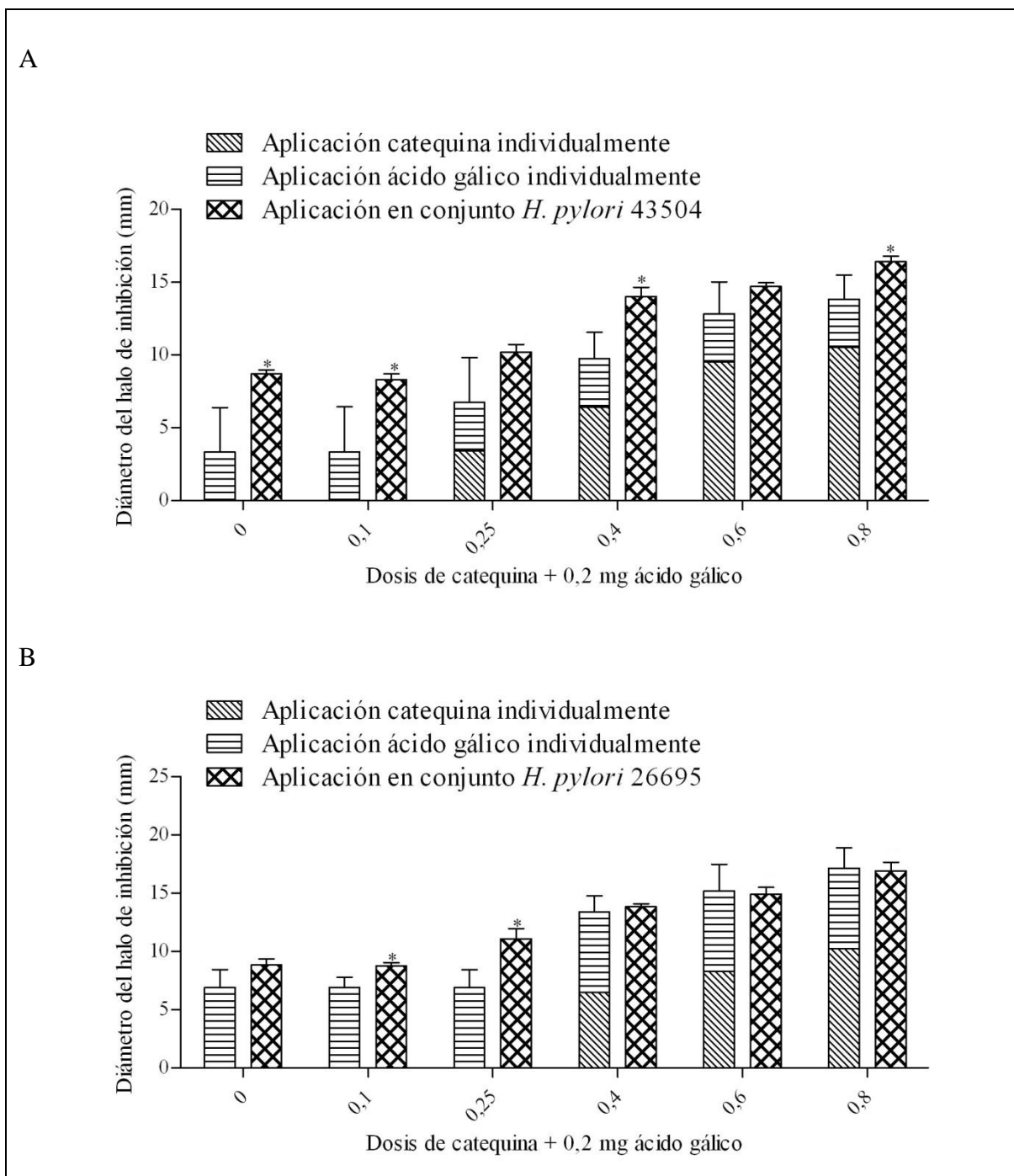


Figura 15. Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de *H. pylori* cepa 43504 (A) y 26695 (B). (*) Indica una diferencia estadísticamente significativa entre la aplicación en forma individual y en conjunto ($p < 0,05$).

Efecto antibacteriano del ácido gálico en presencia de catequina.

Para evaluar el efecto antibacteriano del ácido gálico sobre *E. coli* en presencia de catequina, se sembró *E. coli* en medio LB agar y se aplicaron dosis crecientes de ácido gálico y una dosis fija de catequina (Cuadro 4). Luego de esto, se incubó la bacteria por 24 horas y se midió el diámetro del halo de inhibición. Fue posible observar, diferencias significativas entre los tratamientos individuales y en conjunto ($p < 0,05$), siendo mayor el diámetro de los halos que se generan cuando los compuestos se aplican en forma individual, lo que sugeriría que no existe un efecto aditivo. De la misma manera, es importante señalar que no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento control (0 mg de ácido gálico + 7,5 mg de catequina) con los tratamientos restantes del estudio.

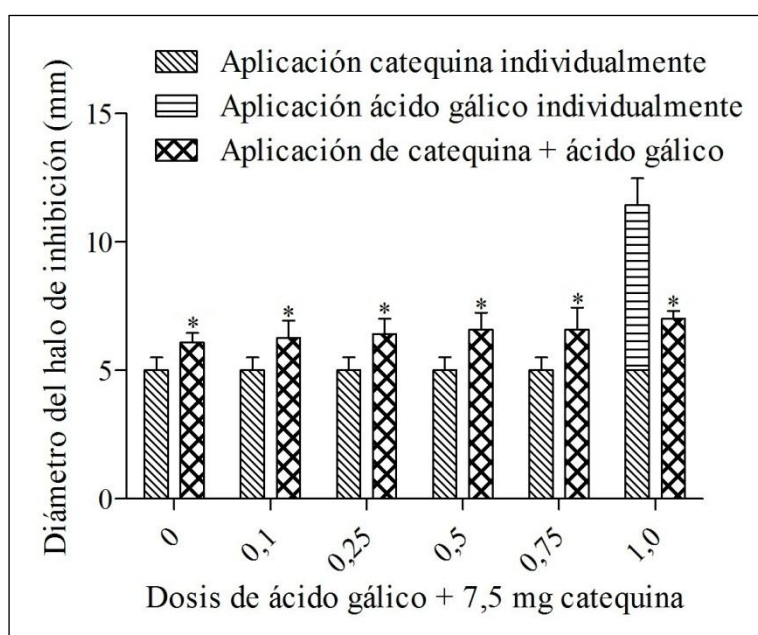


Figura 16. Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli*. La bacteria fue tratada con dosis crecientes de ácido gálico + 7,5 mg de catequina. (*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre la aplicación de forma individual de los polifenoles en relación a la aplicación en conjunto ($p < 0,05$).

Para evaluar el efecto antibacteriano de la catequina sobre *H. pylori* en presencia de ácido gálico, se sembró *H. pylori* en medio TSA y se aplicaron dosis crecientes de ácido gálico en presencia de una dosis fija de catequina, tal como se indica en el Cuadro 3. La bacteria se incubó por 48 horas y luego se midió el diámetro de los halos de inhibición (Figura 17 A y B).

Al aplicar individualmente cantidades de 0,4 mg de catequina se observaron diámetros de halos de inhibición de 7 y 9 mm en las cepas 26695 y 43504, respectivamente. Por su parte, al agregar ácido gálico al medio, los diámetros de los halos de inhibición fueron observados

a partir de los 0,2 mg de ácido gálico en ambas cepas (Figura 17). Es interesante señalar, que a partir de esta dosis de ácido gálico, se observaron los efectos significativos de ambos polifenoles colocados en conjunto en la cepa 26695, observándose diámetros de halo de inhibición significativamente menores en comparación con los fenoles colocados individualmente. Nótese que para el caso de la cepa 43504, la aplicación en conjunto de ambos polifenoles no provocó una modificación del diámetro del halo de inhibición con respecto a los mismos compuestos aplicados individualmente.

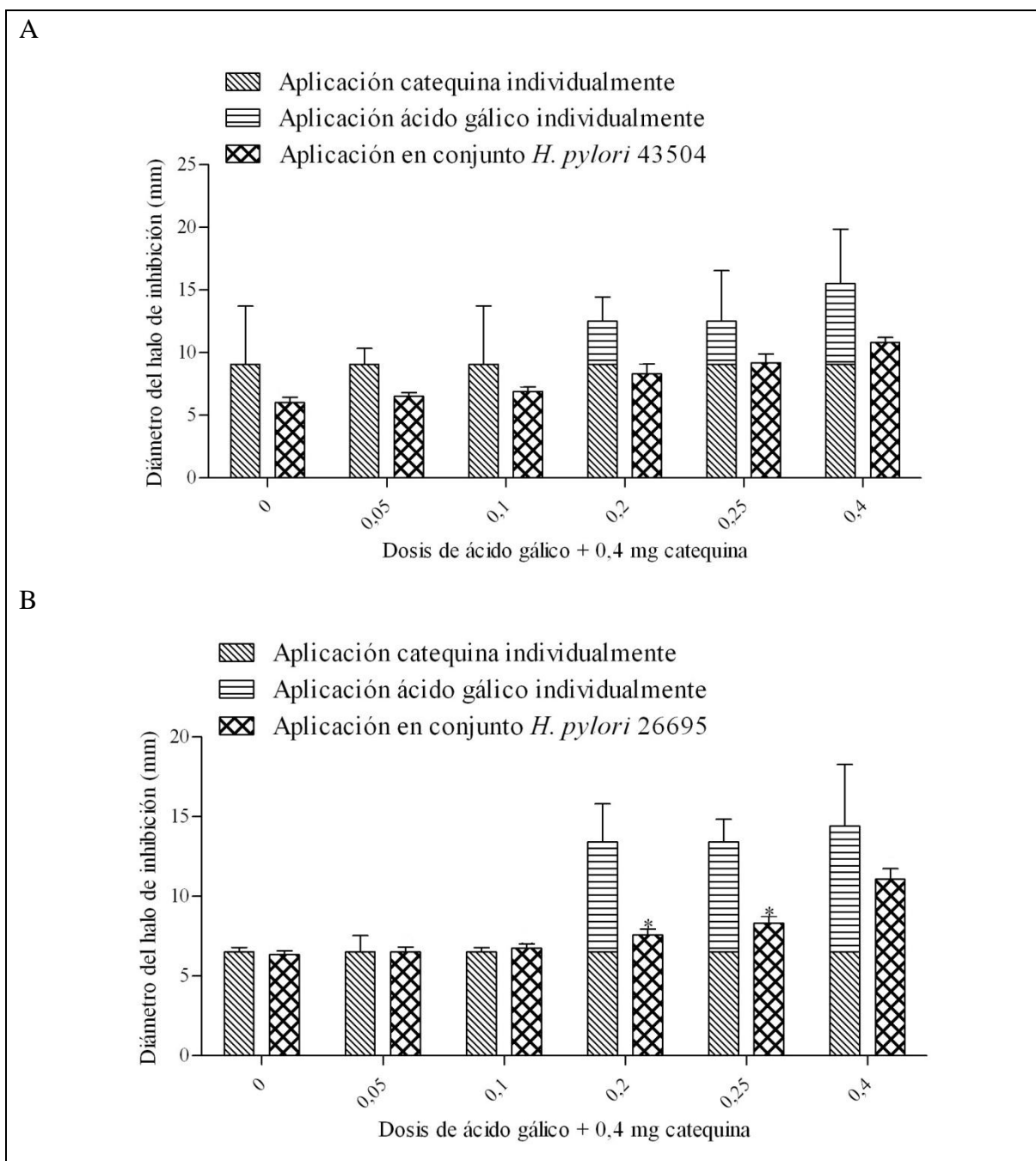


Figura 17. Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de *H. pylori* cepa 43504 (A) y 26695 (B). (*) Indica una diferencia estadísticamente significativa entre la aplicación en forma individual y en conjunto ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

- El ácido gálico y la catequina presentan actividad bactericida sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* en cultivo.
- El ácido gálico y la catequina presentan una acción antibacteriana frente a *H. pylori* hasta 10 veces mayor respecto de *E. coli*.
- El ácido gálico posee mayor actividad bactericida que la catequina, sobre las dos bacterias.
- No existe diferencia en la sensibilidad entre las dos cepas de *Helicobacter pylori* estudiadas a los dos polifenoles utilizados.
- El efecto sinérgico de los dos polifenoles es variable y está relacionado con las dosis de ácido gálico y catequina que se presenten.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboderin O., A. Abdu, B. Wumi, I. Okeke, O. Lawal, D. Ndububa, E. Agbakwuru and A. Lamikanra. 2007. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* from patients in Ile-Ife, South-west, Nigeria. *African Health Sciences* 7(3):143-147.
- Bonacorsi C., M.E.G. Raddi, I. Carlos, M. Sannomiya and W. Vilegas. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9: 2.
- Brown J., G. Huang, V. Haley-Zitlin and X. Jiang. 2009. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (3): 848-852.
- Cheyrier V., M. Moutounet y P. Sarni-Manchado. 2003. Los compuestos fenólicos. P. 114. In Flanzly C. 2003. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. 2da Ed. Mundi-Prensa Libros, España. 797p.
- Cimanga K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. De Bruyne, N. Hermans, J. Totte, L. Pieters and A.J. Vlietinck. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 213–220 .
- Dorman H. and S. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308–316.
- Eydelnant I. and N. Tufenkji. 2008. Cranberry derived proanthocyanidins reduce bacterial adhesion to selected biomaterials. *Langmuir* 24: 10273-10281.
- Ghiselli A., M. Nardini, A. Baldi and C. Scaccini. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an italian red wine. *American Chemical Society* 42(2): 361-367.
- Howden, C. and R. Hunt. 1998. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. *The American journal of Gastroenterology* 93 (12): 2330-2338.
- Glupeczynski Y. 1998. Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*: a global overview. p. 398. In Hunt R. and G. Tytgat. *Helicobacter pylori: Basic Mechanisms to Clinical Cure* 1998. Springer, UK. 507p.
- Goodwing, CS, J. Armstrong, T. Chilvers, M. Petters, MD Collins, L. Sly, W. McConnell and W. Harper. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. *International Journal of Sistematic Bacteriology*. 39: 397-405.

Hernández M. y E. Prieto. 1999. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 18 (1): 12-14.

Hertog M., D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti, S. Nedeljkovic, M. Pekkarinen, B. Simic, H. Toshima, E. Feskens, P. Hollman, M. Katan. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine* 155 (4): 381-386.

Howden, C. and R. Hunt. 1998. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. *The American Journal of Gastroenterology* 93(12): 2330-2338.

Iwasaki, Y., T. Matsui and Y. Arakawa. 2004. The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats. *Journal of Gastroenterology* 39: 831-837.

Kim T., J. Silva and Y. Jung. 2009. Antibacterial activity of fresh and processed red muscadine juice and the role of their polar compounds on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 107: 533-539.

Longanga A., A. Vercruysea and A. Foriers. 2000. Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). *Journal of Ethnopharmacology* 71: 411-423.

Mabe K., M. Yamada, I. Oguni and T. Takahashi. 1999. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (7): 1788-1791.

Mahady G., S. Pendland and L. Chadwick. 2003. Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *The American Journal of Gastroenterology* 98 (6): 1440-1441.

Manach C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert and C. Rémésy. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 230– 242.

Middleton E., C. Kandaswami and T. Theoharides. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52: 673–751.

Mobley H. and P. Foxall. 1997. Differentiation of *H. pylori* strains using PCR RFLP. p 119. In Clayton C., Mobley H. eds. (1997). *Helicobacter pylori* protocols. Human Press, New Jersey, USA. 275p.

Monagas M., B. Bartolomé and C. Gómez. 2005. Updated knowledge about the presence of

- phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 85–118.
- Musa A., M. Sule, A. Haruna, M. Ilyas, I. Iliya, A. Yaro and M. Magaji. 2008. Preliminary gastrointestinal studies of methanol extract of *Indigofera pulchra* willd in rodents. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences* 7 (1): 86–92.
- O’Gara E., D. J. Hill and D. J. Maslin. 2000. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (5): 2269-2273.
- Rodríguez M., M. Alberto, M. Manca de Nadra. 2005. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18: 93-101.
- Romero C., E. Medina, J. Vargas, M. Brenes and A. De Castro. 2007. In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 680-686.
- Ruggiero, P., G. Rossi, F. Tombola, L. Pancotto, L. Lauretti, G. Del Giudice and M. Zoratti. 2007. Red wine and green tea reduce *H. pylori*- or *VacA*- induced gastritis in a mouse model. *World Journal of Gastroenterology* 13 (3): 349-354.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Press. New York.
- Shin, J.E., J.M. Kim, E.A. Bae, Y.J. Hyun and D.H. Kim. 2005. In vitro inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Plant Med* 71: 197-201.
- Smith A., J. Imlay and R. Mackie. 2003. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (6): 3406–3411.
- Stevens K., B. Sheldon, A. Klapes, and T. Klaenhammer. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (12): 3613-3615.
- Sussman M. 1997. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. pp. 4, 11. Cambridge University Press, UK. 639 p.
- Tombola F., S. Campello, L. De Luca, P. Ruggiero, G. Del Giudice, E. Papini and M. Zoratti. 2003. Plant polyphenols inhibit *VacA*, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters* 543: 184-189.
- Vattem D., Y. Lin, R. Ghaedian and K. Shetty. 2005. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochemistry* 40: 1583-1592.

Yahiro, K., D. Shirasaka, M. Tagashira, A. Wada, N. Morinaga, F. Kuroda, O. Choi, M. Inoue, N. Aoyama, M. Ikeda, T. Hirayama, J. Moss and M. Noda. 2005. Inhibitory effects of polyphenols on gastric injury by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Helicobacter* 10 (3): 231-239.

Yamaoka, Y. 2008. *Helicobacter pylori* – Molecular genetics and cellular biology. pp. ix, 1, 3. Horizon Scientific Press, UK. 261p.

Yilmaz Y., R. Toledo. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and acid gallic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 255-260.

Yoon S., H. Jeong, S. Kwon and J. Kim. 2009. Genomics, biological features and biotechnological applications of *Escherichia coli* B: “Is B for better?”. p. 2. In Lee S. *System Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. Springer, Korea. 462p.